

C型肝炎ウイルスの胆汁感染，インターフェロン再投与時の反応性，血中免疫複合体形成に関する研究

著者	齋藤 幸恵
号	1245
発行年	1995
URL	http://hdl.handle.net/10097/21084

論文内容要旨

【目 的】

慢性 C 型肝炎でみられる胆管炎の発生病理，インターフェロン（IFN）再治療の可能性，C 型肝炎ウイルス（HCV）の免疫複合体の臨床的意味を明らかにするために，RT-PCR 法を用いて以下につき検討した。

- (1) 慢性 C 型肝炎患者胆汁中の HCV-RNA の検出。
- (2) IFN 再治療のウイルス学的検討。
- (3) IFN 治療後の慢性 C 型肝炎患者血中の naked HCV と免疫複合体の検出。

【対 象】

- (1) 慢性 C 型肝炎 7 例（うち 2 例は IFN 投与中）と，HCV-RNA 及び HCV 抗体陰性で肝機能正常の対照患者 4 例の胆汁を用いた。Double-lumen tube を十二指腸まで挿入し，胆汁を 4℃ で採取した。胆汁及び胆汁採取時血清の HCV-RNA を測定した。慢性 C 型肝炎患者肝生検は，胆汁採取 20 日以内に施行した。
- (2) 初回 IFN 投与で著効が得られず，IFN を再投与した慢性 C 型肝炎 12 例で検討した。IFN 投与後，ALT 値 40 IU/L 以下を示した例を responder，それ以外を nonresponder とした。IFN 投与量は初回治療で平均 227.8MU，再治療で平均 270.7MU であり，初回治療，再治療において IFN 投与直前，終了時の血清につき定量的 RT-PCR 法で HCV 量を測定した。
- (3) IFN 治療を受けた慢性 C 型肝炎 8 例（著効：3 例，無効：5 例）で，IFN 投与直前，終了時，終了 1 ヶ月後，3 ヶ月後，6 ヶ月後の血清を用い，ALT 値，免疫複合体の有無につき検討した。

【方 法】

定性的 RT-PCR：検体（血清，胆汁又は免疫グロブリン処理した上清と沈殿）100 μ l より RNA を抽出し，プラス鎖 HCV-RNA 検出用又はマイナス鎖 HCV-RNA 検出用プライマーで cDNA を合成した後 RT-PCR を行った。

定量的 RT-PCR： $10^1 \sim 10^{10}$ copies/ μ l のスタンダード DNA を作製した。検体の HCV 定量は，100 μ l の血清より RNA を抽出後 cDNA を合成し，cDNA と [α - 32 P]dCTP を 20 μ Ci/ml 含む反応液で PCR 反応を行った。PCR 反応毎にスタンダード DNA を入れた。PCR 反応産物に取り込まれた [α - 32 P]dCTP の量を，BAS-2000 で測定した。

HCV の免疫複合体の検出：あらかじめ血清と抗体の混合比に関して検討を行い、患者血清を 1000 倍希釈とした。血清中の細胞成分を除く為、遠心した後上清に同量の 4 倍希釈ウサギ由来抗ヒト免疫グロブリンを加え、4℃で一晩静置した。遠心して上清と沈殿に分離し、各々につき RT-PCR 法で HCV-RNA の有無を検討した。

【結果及び考察】

(1) HCV-RNA 陽性の血清に、胆汁あるいは緩衝液のみを加え、RNA を抽出し PCR を行ったところ、添加した胆汁量に比例して PCR 反応は抑制されたが、血清 HCV-RNA 陽性の IFN 治療前の 5 症例全例の胆汁中に、プラス鎖 HCV-RNA が検出された。マイナス鎖 HCV-RNA は全例検出されなかった。一方、血清プラス鎖 HCV-RNA が陰性の 6 例（2 例 IFN 治療中）全例で胆汁中に HCV-RNA は検出されなかった。胆汁中への血液混入の可能性は否定され、HCV が胆汁中に分泌されていると考えられた。現在まで、胆汁中 HCV-RNA の報告はない。

肝組織像では、7 例中 3 例にリンパ球浸潤を伴った胆管炎を認め、胆管炎を認めた 3 例中 2 例は胆汁中 HCV-RNA 陽性、1 例は陰性（IFN 治療中）であった。胆汁中 HCV-RNA と胆管炎の因果関係は未だ不明だが、胆管細胞の HCV 感染は否定できない。

(2) 初回 IFN 投与前の血清中 HCV 量は $10^6 \sim 10^8$ copies/ μ l であったが、responder では 5 例全例で HCV 量が低下し、2 例で 10^4 copies/ μ l 以下となった。一方 nonresponder では同様に HCV 量は低下したが、 10^4 copies/ μ l 以下は 1 例もなかった。再治療直前の HCV 量は、12 例中 6 例で初回 IFN 投与前の HCV 量と同量、2 例で増量、3 例で減量していた。IFN 再投与終了時の HCV 量は、 10^8 copies/ μ l より変化しなかった 1 例を除き全例低下した。以上より再治療時には、初回より強い抗ウイルス作用が必要と考えられた。再治療時 HCV 量が低下しなかった例を認めたが、この症例は、変異により IFN 抵抗性を獲得した可能性が考えられた。

(3) 無効例の 5 例中 2 例で、IFN 投与前で沈殿にのみ HCV-RNA が検出されたが、1 例では投与終了 1 ヶ月後と 3 ヶ月後で、他の 1 例では投与終了 6 ヶ月後で、沈殿と共に上清に HCV-RNA が検出された。上清中の HCV は肝機能異常時に出現しており、escape mutant の可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、プラス鎖 RNA ウイルスである C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus : HCV) について、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法を用い、その存在様式、インターフェロン治療とウイルス量、ウイルス変異について検討している。

HCV は主に血液を介して伝播し、感染を起こせば高率に慢性化し慢性肝炎、肝硬変、さらには肝癌を起こすため、その感染経路、予防、治療は重要である。HCV は血液、肝組織、唾液、尿中には同定されてきたが、胆汁に関しては現在のところ報告はない。本研究では、慢性 C 型肝炎患者胆汁中の HCV-RNA の存在を確認し、さらには、原因は不明であるが、慢性 C 型肝炎で高率にみられる胆管炎の発生病理についても考察している。また、マイナス鎖 HCV-RNA の検出には十分な基礎検討を行っている。本研究は HCV の感染様式、胆管炎の発生病理の研究に寄与すると考えられる。

ウイルス量に関しては、既報の定量法より幾分感度は落ちるものの、より簡便で、かつ多検体処理可能な方法を確立している。さらにインターフェロン治療とウイルス量について検討し、インターフェロン無効症例の再治療の方針をたてる上で、ウイルス量が重要であることを明確にした。

ウイルス変異については、本研究により HCV の escape mutation が生体内でもおこり、インターフェロン治療で誘導される可能性も示された。近年、ウイルス変異は免疫学的反応、治療との関連が注目されており、今後さらに検討の必要な分野である。本論文では、その変異の意義を最新の知見で考察を加えている。

以上のように本論文は、HCV について基礎的、臨床的両面より明らかにしたものであり、学位論文に値するものと考えられる。